

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**CITOTOXICIDAD DE LA NEUROTOXINA BOTULÍNICA BtxA SOBRE
CÉLULAS MADRE DE PAPILA APICAL *IN VITRO***

POR

LILIA KARINA SÁNCHEZ RAMÍREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA
DE ENDODONCIA**

NOVIEMBRE, 2019

**CITOTOXICIDAD DE LA NEUROTOXINA BOTULINICA Bt_xA SOBRE
CÉLULAS MADRE DE PAPILA APICAL *IN VITRO***

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Comité de Tesis

DRA. FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ
Director de Tesis

DR. CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA
Co-Director de Tesis

DRA. EYRA ELVYRA RANGEL PADILLA
Asesor metodológico

DR. JORGE JAIME FLORES TREVIÑO
Asesor metodológico

DR. GUSTAVO ISRAEL MARTÍNEZ GONZÁLEZ
Asesor estadístico

**CITOTOXICIDAD DE LA NEUROTOXINA BOTULINICA BtxA SOBRE
CÉLULAS MADRE DE PAPILA APICAL *IN VITRO***

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA
DE ENDODONCIA**

Comité Académico

DR. GUSTAVO ISRAEL MARTÍNEZ GONZÁLEZ
Presidente

DRA. FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ
Secretario

DRA. MYRIAM ANGELICA DE LA GARZA RAMOS
Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Casiano Del Angel Mosqueda** por confiar en mí. Gracias por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo, ya que sin su apoyo y dedicación esta investigación no habría sido posible.

Al **Dr. Jorge Jaime Flores Treviño** por su ayuda, dedicación y asesoramiento. La amabilidad y la confianza demostrada en cada momento han sido de un gran apoyo durante todo el tiempo de mi maestría.

A mi familia que siempre me apoyó para seguir con mi gran pasión que es la Endodoncia, siempre brindándome su amor incondicional.

A mis padres en especial que sin ellos nada de esto pudiera ser posible, son mi pilar para siempre seguir adelante:

- Roberto, gracias por la motivación que tengo de cada día ser mejor persona y profesional. Qué mejor ejemplo tengo que el tuyo siempre firme y convincente.
- Lilia, gracias porque me haces confiar siempre en mí, por acompañarme en cada caída con tus palabras de aliento y tus buenos deseos.

Gracias a Dios por darme el don de la vida, la voluntad y la oportunidad de estudiar lo que más me gusta.

A mis maestros quienes con paciencia y dedicación contribuyeron en mi formación académica.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
NOMENCLATURA.....	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos específicos	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Endodoncia.....	5
4.2 Regeneración dentino - pulpar	6
4.3 Células madre.....	9
4.4 Células madre de papila apical (SCAPs).....	10
4.5 Neurotoxina botulínica.....	12
4.6 Neurotoxina botulínica BtxA	14
5. MÉTODOS.....	17
6. RESULTADOS.....	21
7. DISCUSIÓN.....	24
8. CONCLUSIONES.....	26
9. LITERATURA CITADA	27
10. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	33

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Comparación entre grupo control y grupos experimentales sobre.....	19
la viabilidad de células madre de papila apical (SCAPs).	

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Incubación de las SCAPs y vista en microscopio.....	17
2 Lector de placas ELISAS 96 pozos.....	18
3 Incubación por 24 horas de las SCAPs.....	18
4 Dispensador Micro Fill.....	19
5 Cultivo de las SCAPs in vitro mediante incubación.....	21
6 Grafico de viabilidad celular de las SCAPs posterior a 24 hrs de exposicion a la toxina botu en diferentes concentraciones.	22
7 Micrografias de las SCAPs posterior a 24 hrs de exposicion..... a la toxina botulínica en diferentes concentraciones.	23

NOMENCLATURA

BtxA	Neurotoxina botulínica tipo A
BoNT	Neurotoxina botulínica
SCAPs	Células madre de papila apical
FMCA	Ensayo de citotoxicidad por fluorometría
AAE	Asociación Americana de Endodoncia
FSP-1	Proteína 1 específica de fibroblastos
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblasto
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
TGF-β1	Factor de crecimiento tumoral beta 1
HSC	Células madre hematopoyéticas
HC	Cadena Pesada
LC	Cadena Ligera
NAPs	Proteínas no tóxicas auxiliares (NAPs)
U	Unidades

FDA Diacetato de fluorosceína

PBS Buffer de fosfatos

DMSO Dimetilsulfóxido

DMEM-F12 Dulbecco's modified Eagle's medium-Ham's F12

TESISTA: LILIA KARINA SÁNCHEZ RAMÍREZ
DIRECTOR DE TESIS: DRA. FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ
CODIRECTOR DE TESIS: DR. CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

RESUMEN

Introducción: La neurotoxina botulínica (BtxA) la describió Scott por primera vez aplicada al manejo del estrabismo en humanos. Posteriormente, esta toxina fue aprobada como tratamiento de numerosos trastornos de espasticidad y una serie de otras condiciones, utilizándose ampliamente en el área biomédica. **Objetivo:** El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico de la BtxA sobre células madre de papila apical (SCAPs) *in vitro*. **Metodología:** La toxicidad de la BtxA (Alergan 100U) se analizó en diferentes concentraciones (15, 10, 5, 3, 1, .5, .3, .1, .05, .03, .01, .005, .003, .001U mg /mL) sobre SCAPs utilizando microscopía de campo claro y el ensayo de citotoxicidad FMCA. **Resultados:** La exposición de las SCAPs a la BtxA no indujo muerte celular de forma dependiente de la dosis ($P < 0.05$). Todas las concentraciones excepto la más alta (15U) no produjeron cambios significativos sobre la viabilidad celular y su morfología ($p < 0.05$). **Conclusiones:** Estos datos sugieren que la BtxA podría utilizarse en procedimientos de regeneración endodóntica debido a su baja citotoxicidad.

Palabras clave: Regeneración endodóntica, Neurotoxina botulínica BtxA, Citotoxicidad, Células madre de papila apical.

TESISTA: LILIA KARINA SÁNCHEZ RAMÍREZ
DIRECTOR DE TESIS: DRA. FANNY LÓPEZ MARTÍNEZ
CODIRECTOR DE TESIS: DR. CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

ABSTRACT

Introduction: Botulinum neurotoxin (BtxA) was described by Scott for the first time applied to the management of strabismus in humans. Subsequently, this toxin was approved as a treatment for numerous spasticity disorders and a number of other conditions, widely used in the biomedical area. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the cytotoxic effect of BtxA on stem cells of the apical papilla (SCAPs) in vitro. **Methodology:** The toxicity of BtxA (Allergan 100U) was analyzed in different concentrations (15, 10, 5, 3, 1, .5, .3, .1, .05, .03, .01, .005, .003, .001U mg / mL) on SCAPs using clear field microscopy and the FMCA cytotoxicity assay. **Results:** The exposure of SCAPs to BtxA did not induce cell death in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). All concentrations except the highest 15U did not produce significant changes on cell viability and morphology ($p < 0.05$). **Conclusions:** These data suggest that BtxA could be used in endodontic regeneration procedures due to its low cytotoxicity.

Keywords: Endodontic regeneration, BtxA botoulinic neurotoxin, Cytotoxicity, Apical papilla stem cells.

1. INTRODUCCIÓN

El recubrimiento pulpar directo y la pulpotomía en los casos de exposición pulpar es uno de los enfoques terapéuticos de la terapia pulpar vital. La pulpotomía continúa siendo el tratamiento más común para las pulpas expuestas por caries en los molares deciduos (AAPD, 2014).

La terapia pulpar vital tiene como objetivo el mantenimiento de la vitalidad y la función de la pulpa en el tratamiento de las lesiones pulpares reversibles en los dientes permanentes y primarios (Fuks, 2008).

En el caso de exposición pulpar, la pulpa amputada se puede reparar por sí misma o después de la aplicación de materiales de recubrimiento (Fuks, 2006).

La creciente y reciente investigación sobre los materiales endodónticos está encaminada a desarrollar biomateriales que estimulen la regeneración/ formación de dentina y hueso (Caicedo *et al.*, 2006).

Las características ideales de un medicamento para la pulpotomía incluyen tener propiedades bactericidas, ser biocompatible, promover de la cicatrización de la pulpa radicular, ayudar a la regeneración del complejo dentinopulpar y no interferir en los procesos fisiológicos de la reabsorción radicular (Zhang *et al.*, 2010).

La toxina botulínica es una de las sustancias biológicas más potentes conocidas. Es una neurotoxina producida por la bacteria *Clostridium botulinum*, anaerobia, grampositiva y formadora de esporas que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo, el agua y las vías intestinales de los animales (Münchau *et al.*, 2000).

La neurotoxina botulínica tipo A (BtxA) se ha aplicado ampliamente en terapias clínicas que incluyen hiperhidrosis, espasticidad, hipertrofia muscular facial y contracción muscular en humanos (Jiang *et al.*, 2018).

Estudios han demostrado que la BtxA puede prevenir efectivamente la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos al inhibir la expresión de α -SMA. Además, BtxA puede suprimir notablemente la proliferación de fibroblastos en el tejido cicatricial al inhibir la expresión de α -SMA y miosina II (Jeong *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016), sin embargo, recientemente ha sido descrita su interacción con receptores de superficie celular relacionados con la osteogénesis.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico de la neurotoxina botulínica tipo A en células madre de papila apical (SCAPs) in vitro con el propósito futuro de estudiar a la BtxA como material de regeneración de tejido mineralizado. Hipotizamos que la neurotoxina botulínica BtxA tiene baja toxicidad sobre SCAPs y los resultados proporcionaron evidencia de que la BtxA efectivamente no es citotóxica en las SCAPs.

2. HIPÓTESIS

La neurotoxina botulínica BtxA tiene baja citotoxicidad sobre SCAPs *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto citotóxico de la neurotoxina botulínica BtxA sobre SCAPs *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar una subpoblación de SCAPs utilizando incubación.
- Determinar la tasa de viabilidad celular de las SCAPs expuestas a la BtxA en diferentes concentraciones utilizando el método de FMCA.
- Analizar los cambios morfológicos de las SCAPs expuestas a la BtxA en diferentes concentraciones utilizando microscopía de campo claro.

4. ANTECEDENTES

4.1 Endodoncia

La terapia endodóntica convencional es el tratamiento de elección para la mayoría de los pacientes con evidencia de daño pulpar y perirradicular, permitiéndonos la eliminación del proceso inflamatorio o infeccioso, conservando así el diente en función en un elevado porcentaje de casos (Gutmann *et al.*, 1985).

El objetivo principal consiste en conservar la dentición, aliviar el dolor y reestablecer la capacidad funcional y el aspecto estético de los pacientes (Torabinejad and Walton 2010).

En una endodoncia se debe obturar el conducto después de una buena instrumentación y limpieza. El conocimiento de la anatomía y morfología del conducto radicular y sus variaciones depende también del éxito del tratamiento (Vertucci, 1984).

Limpieza, conformación y obturación son los procedimientos que se requiere de mayor esfuerzo para el éxito del tratamiento por su complejidad en su anatomía, áreas irregulares, retirar debris y los istmos que se encuentran (Ordinola-Zapata *et al.*, 2009).

Con base en los signos, los síntomas y el examen de los pacientes, se describen cuatro condiciones pulpaes clínicas: normal, reversible, inflamada, irreversiblemente inflamada o necrótica (Levin *et al.*, 2009).

La principal diferencia clínica entre la pulpitis reversible e irreversible es la respuesta de la pulpa al estímulo térmico. La pulpitis reversible presenta una respuesta exagerada pero no prolongada al estímulo frío. Por otra parte, la pulpitis

irreversible se caracteriza por un dolor constante y espontáneo con una respuesta exagerada y prolongada al estímulo frío (Michaelson and Holland G 2002).

El examen clínico incluye diferentes procedimientos tales como inspección, sensibilidad de la pulpa a estímulos térmicos o eléctricos y dolor a la palpación o percusión. Aparentemente, estos procedimientos no cambiaron mucho en el último siglo (Mejare *et al.*, 2012).

En la pulpitis reversible, se espera que la pulpa se recupere después de la eliminación del estímulo causante. Por el contrario, si la pulpa se inflama irreversiblemente, no se espera la cicatrización y se indica pulpectomía (es decir, extracción completa de la pulpa dental) (Staquet *et al.*, 2011).

4.2 Regeneración Dentino – Pulpar

La regeneración endodóntica, la rama más nueva de la Odontología, estudia el potencial de la regeneración de la pulpa dañada, así como la creación y entrega de tejidos de dentina pulpa de reemplazo (Murray *et al.*, 2007).

La reparación es la sustitución del tejido dañado por tejido diferente del tejido original y la pérdida de funciones biológicas (Majno and Joris, 2004).

Se ha definido como "procedimientos basados en la biología diseñados para reemplazar las estructuras dañadas, incluidas las estructuras de la raíz y la dentina, así como las células del complejo pulpa-dentina" (Diogenes *et al.*, 2016).

Las posibles técnicas de la regeneración endodóntica incluyen la revascularización del conducto radicular, los implantes de pulpa, la impresión celular tridimensional, la terapia con células madre, los implantes de andamios, los andamios inyectables y la terapia génica (Murray *et al.*, 2007).

Las consideraciones clínicas de la Asociación Americana de Endodoncia (AAE) para procedimientos endodónticos regenerativos definen el éxito por tres medidas: Meta principal (esencial): la eliminación de síntomas y la evidencia de curación ósea. Objetivo secundario (deseable): aumento del grosor de la pared de la raíz y / o aumento de la longitud de la raíz. Objetivo terciario: respuesta positiva a las pruebas de vitalidad (AAE).

La pulpa dental es bastante compleja y contiene una población de fibroblastos. Todos expresan proteína de superficie de fibroblastos (FSP-1), receptores tipo IA y tipo II de proteínas morfogenéticas óseas y receptores del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Moule *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 1996).

Las caries y los traumatismos pueden alterar el complejo dentina – pulpa y provocar una reacción inflamatoria, que es el paso inicial de la regeneración de los tejidos (Kim *et al.*, 1998).

La regeneración tiene como objetivo restaurar la integridad del complejo dentina – pulpa y también mantener la vitalidad y función de los dientes (Kim *et al.*, 1998).

Dependiendo de la gravedad de la alteración del tejido, la regeneración de la dentina – pulpa puede variar desde una regulación positiva de la actividad sintética del odontoblastos, que conduce a la regeneración de una dentina protectora para completar la regeneración (Kim *et al.*, 1998).

Esta regeneración completa requiere de síntesis reparativa de dentina, neoangiogénesis e inervación. Todos estos procesos están orquestados por factores de crecimiento secretados principalmente por fibroblastos pulpares (Smith *et al.*, 2001).

La dentina fue la primera fuente identificada de moléculas capaces de inducir regeneración de la dentina – pulpa, igualmente la pulpa representa otra fuente que induce la regeneración después de lesiones traumáticas.

Se ha demostrado que los fibroblastos de pulpa humana secretan factor de crecimiento de fibroblasto básico (FGF-2), VEGF y factor de crecimiento derivado de plaquetas *in vitro*.

La regeneración de los tejidos se produce de forma natural debido a la existencia de células madre con la capacidad de autorregenerarse y diferenciarse (Rodriguez *et al.*, 2011).

Trabajos recientes han demostrado que cuando la dentina se ha expuesto, hay solubilización de proteínas, como el factor de crecimiento tumoral beta 1 (TGF- β 1), el cual puede inducir la modulación de las células del linaje odontoblástico y generar la dentinogénesis reparativa (14-16) o la estimulación directa de los odontoblastos para producir matriz extracelular y el depósito de nuevo mineral a través de una dentinogénesis reaccionaria (Ferracane *et al.*, 2010; Tomson *et al.*, 2007).

Los biocerámicos se introdujeron por primera vez como un material de obturación retrógrada en la década de 1990 y más tarde como sellador (Atmeh *et al.*, 2012; Koch., 2012).

Su biocompatibilidad lo hace ideal para los tejidos, como se indicó anteriormente, los materiales biocerámicos son biocompatibles, no se contraen y son químicamente estables en un ambiente húmedo. Esto permite que el material forme una capa de hidroxiapatita que refuerza la unión entre la dentina y el material bioactivo (Reyes-Carmona *et al.*, 2009).

La absorción de elementos desde el material hacia la dentina provoca ciertos cambios en la dentina, aumenta la resistencia química contra los ácidos y la fuerza física e induce la remineralización (Hotta *et al.*, 2001).

La formación de una capa interfacial y estructuras similares a la dentina pueden minimizar la micro filtración y aumentar la resistencia a la expulsión al mejorar la adaptación marginal de los cementos biocerámicos (Torabinejad *et al.*, 2010).

Entre los mecanismos de acción de estos medicamentos se encuentran desvitalización, preservación y regeneración. Los biocerámicos deben tener la propiedad de inducir la diferenciación de nuevos odontoblastos y, por ende, la función de la formación de dentina reparativa en la unión dentinopulpar (Ranly *et al.*, 2000; Tziafas *et al.*, 2001).

Los avances en la investigación biomédica han generado nuevos materiales para su uso en tratamientos, con miras a la regeneración del complejo dentinopulpar. Comprender los mecanismos moleculares y celulares que regulan la dentinogénesis durante la reparación de tejido dental y su potencial para la explotación clínica ha permitido tener nuevos enfoques (Fuks., 2008).

Las consideraciones actuales no solo se encaminan a entender la interacción entre el material y el tejido dental en términos de biocompatibilidad, sino principalmente a entender el potencial del material para modular la respuesta del tejido intervenido (Ferracane *et al.*, 2010).

4.3 Células madre

El término ruso fue propuesto para uso científico por el histólogo ruso Alexander Maksimov en 1909. Alexander Maximo v fue el primero en sugerir la existencia de células madre hematopoyéticas (HSC) con la apariencia morfológica

de un linfocito, capaz de migrar a través de la sangre a nichos microecológicos eso les permitiría proliferar y diferenciarse a lo largo de (Ramalho *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista de su capacidad reproductiva y funcional, las células madre se han definido como aquellas que pueden dividirse simultáneamente para mantener su autorrenovación, con producción de otras semejantes a ellas y generar células hijas que se diferencian en diversos tipos de unidades especializadas, tanto morfológica como funcionalmente. Además de lo anterior se le han añadido otras propiedades, atribuibles a sus capacidades para la implantación persistente en tejidos sanos y dañados (Hernandez, *et al.*, 2004).

Las células madre de la cavidad bucal poseen un potencial de multidiferenciación y pertenecen al grupo de las unidades adultas, capaces de formar células con carácter osteodontogénico, adipogénico y neurogénico (González *et al.*, 2011).

Se ha dedicado especial atención al estudio de las principales células madre en dicha cavidad e identificado 4 grupos: células madre en pulpa de dientes temporales (SHED), células madre en pulpa de dientes permanentes, células madre presentes en espacios periodontales y células madre de la mucosa bucal (González *et al.*, 2011).

4.4 Células madre de papila apical (SCAPs)

Las SCAPs representan una población de células madre/ progenitoras mesenquimales tempranas que residen en el ápice de la raíz de los dientes permanentes inmaduros (Wang *et al.*, 2012).

Muchos estudios en término de regeneración dental se basan en SCAPs y han sido testigos de un progreso alentador. Por lo tanto, las SCAPs son un recurso

confiable de células de siembre para la regeneración de tejido dental (Zhai *et al.*, 2019).

Las SCAPs son una de las fuentes celulares más importantes para la regeneración de los tejidos. Puede sobrevivir y mantener su tallo en un caso de necrosis pulpar avanzada y periodontitis apical (Sonoyama *et al.*, 2008; Chrepa *et al.*, 2007).

Tiene baja inmunogenicidad y posee propiedades inmunomoduladoras, puede regular de manera efectiva la función biológica de las células T después del cultivo con monocitos de sangre periférica autólogos o alogénicos (Ding *et al.*, 2010).

Se ha informado que no puede estimular la proliferación de células T alogénicas y suprime la proliferación de células T de manera independiente de la apoptosis *in vitro* (Ding *et al.*, 2010).

La terapia pulpar vital preserva la lesión pulpar, estimula la formación de dentina y mantiene la vitalidad de la pulpa dental. El material de cobertura utilizado para la terapia pulpar debe ser seguro y que induzca la curación pulpar (Kisby., 2016).

Es importante analizar diferentes biomateriales en la expresión genética osteogénica y la viabilidad celular de las células madre para aclarar los mecanismos moleculares subyacentes a la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa (Ajlan *et al.*, 2015).

4.5 Neurotoxina Botulínica

La neurotoxina botulínica es el veneno orgánico más fuerte para humanos y animales. Es producida por la bacteria anaerobia, gram positiva, formadora de esporas, en forma de barra *Clostridium botulinum* (Goonetilleke *et al.*, 2004).

La dosis letal humana estimada es de aproximadamente 10 ng por kilogramo de peso corporal si la toxina se inhala y un microgramo si se toma por vía oral (Arnon *et al.*, 2001).

Todas las toxinas botulínicas tienen un peso molecular de aproximadamente 150 kDa y consisten en dos cadenas de polipéptidos, una cadena ligera ~ 50kDa y una cadena pesada ~ 100kDa unidas a través de un único puente disulfuro (Zhang *et al.*, 2017).

La cadena pesada de la toxina se une de forma selectiva e irreversible a los receptores de alta afinidad en la superficie presináptica de las neuronas colinérgicas, y el complejo receptor de toxina es absorbido por la endocitosis. El enlace disulfuro entre las dos cadenas se escinde y la toxina se escapa al citoplasma (Burgen *et al.*, 1949).

La cadena ligera interactúa con diferentes proteínas (proteína asociada a sinaptosoma (SNAP) 25, proteína de membrana asociada a la vesícula y syntaxina) en los terminales nerviosos para evitar la fusión de las vesículas de acetilcolina con la membrana celular (Stanley *et al.*, 1983).

Inhiben la transmisión de señal por acetilcolina en la unión neuromuscular de los nervios motores, lo que resulta en una relajación muscular y es eficaz para suprimir el dolor y la espasticidad (Marciniak *et al.*, 2012).

La toxina botulínica actúa en cuatro sitios diferentes del cuerpo: 1) la unión neuromuscular, los ganglios autónomos, las terminaciones nerviosas parasimpáticas posganglionares y las terminaciones nerviosas simpáticas posganglionares que liberan acetilcolina (Sellin., 1985).

La neurotoxina botulínica lleva a cabo una lisis de las proteínas implicadas en la exocitosis de la acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular, inhibiendo así la descarga colinérgica. Esto ocurre en tres etapas después de que la toxina haya penetrado en el sistema vascular y haya sido transportada a las terminaciones nerviosas periféricas colinérgicas (incluyendo las uniones neuromusculares, las terminaciones nerviosas posganglionares parasimpáticas y los ganglios periféricos) (Degouy *et al.*, 2000).

La cadena H se fija rápida e irreversiblemente a los receptores diana de la superficie de las terminaciones nerviosas presinápticas colinérgicas. A continuación, se pasa a la fase de internalización (endocitosis) del complejo toxina - receptor y la liberación de la cadena L de la toxina al citosol. Por último, dicha cadena L fragmenta la proteína SNAP-25 celular y de esta forma bloquea la liberación de acetilcolina, con su inmediata consecuencia: la parálisis muscular. El sistema nervioso central no resulta afectado (Huang *et al.*, 2000).

Debido a su alta toxicidad, la búsqueda de antitoxinas BTX ha sido un área muy activa de investigación. Se ha demostrado que la capsaicina (compuesto activo responsable del sabor picante de los chiles) puede unirse al receptor TRPV1 expresando en las neuronas colinérgicas e inhibir los efectos tóxicos de la toxina botulínica (Thyagarajan *et al.*, 2009)

Se han descrito siete serotipos de toxinas (BoNT/AG), así como potencialmente tipo H y un tipo X tentativamente nombrado que están menos estudiados (Peck *et al.*, 2017).

Después de muchos años de uso fuera de etiqueta, la eficacia de la toxina botulínica tipo A en el tratamiento de las líneas glabellares ahora está bien documentada en la literatura, y ha obtenido la aprobación regulatoria en varios países. Hay dos fórmulas disponibles: Botox Cosmetic (Allergan, Irvine, CA, EE. UU.) y Dysport (Ipsen Limited Slough, Reino Unido) (Carruthers *et al.*, 2004).

4.6 Neurotoxina Botulínica tipo A (BtxA)

La neurotoxina botulínica (BtxA) la describió Scott por primera vez aplicada al manejo del estrabismo en humanos. Posteriormente, esta toxina fue aprobada como tratamiento de numerosos trastornos de espasticidad y una serie de otras condiciones, utilizándose ampliamente en el área biomédica (Münchau *et al.*, 2000).

La toxina BtxA se administra en forma inactiva, es activada mediante la liberación de las proteínas no tóxicas auxiliares mediadas por actividad de proteasas tisulares (gangliósidos y proteína de vesícula sináptica 2 o SV2), esto a pH fisiológico. Posterior a la activación de la toxina el núcleo proteico se dirigirá a la membrana neuronal en la unión neuromuscular por la que tiene tropismo (Atassi, 2004; Maggio *et al.*, 2006).

Su acción biológica comienza cuando la HC se une a los receptores específicos de alta afinidad en la membrana de la terminal nerviosa colinérgica somática y autonómica en la unión neuromuscular; produciendo endocitosis de la toxina y el receptor (Benecke., 2012).

Una vez dentro de la vesícula, el pH intracelular suscita un cambio conformacional en la proteína que implica la translocación de la LC hacia el citosol. La LC presenta actividad de endopeptidasa dependiente de zinc escindiendo las proteínas N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (SNARE), las

cuales están encargadas de transportar la vesícula con acetilcolina del retículo endoplásmico a la hendidura sináptica, bloqueando la transmisión neuromuscular (Lacy *et al.*, 1998).

El tipo A fue la primera aislada y purificada y es la más frecuentemente usada en la clínica por varias razones: disponibilidad, aspecto inmunológico, seguridad y eficacia. Su mecanismo de actuación es bloquear la liberación de acetilcolina a nivel de las terminaciones nerviosas colinérgicas periféricas por escindir del complejo SNAP-25, proteína necesaria para la fijación y la liberación de acetilcolina de las vesículas situadas en las terminaciones nerviosas (Kranz *et al.*, 2009).

El Allergan es una forma liofilizada estéril de toxina botulínica tipo A. Se produce a partir de un cultivo de la cepa Hall de *C. botulinum* y se purifica mediante una serie de precipitaciones ácidas en un complejo cristalino que contiene la toxina y otras proteínas Schantz *et al.*, 1994).

El FDA aprobó el Botox (Allergan) en diciembre de 1989 como un medicamento huérfano para el tratamiento del estrabismo, los espasmos hemifaciales y el blefaroespasma Schantz *et al.*, 1994).

La actividad específica del Allergan es de aproximadamente 20 unidades / nanogramo de complejo de proteína neurotoxina. Cada frasco de Botox contiene 100 unidades (U) de complejo de neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum*, 0,5 miligramos de cloruro de sodio en forma estéril, secada al vacío y sin conservadores Schantz *et al.*, 1994).

El Allergan es un neuromodulador seguro y efectivo que imparte el efecto estético positivo de reducir las líneas faciales dinámicas (Lorenc *et al.*, 2013).

El área más comúnmente tratada es la región glabelar donde la neurotoxina botulínica Tipo A limita la capacidad de contraer los músculos corrugador superciliar, orbicular de los ojos, procerus y frontal (Dorizas *et al.*, 2014).

5. MÉTODOS

Cultivo de SCAPs

Las células se mantuvieron en medio de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) / Ham's F12 (DMEM/F12) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), L-glutamina 2 mM, 100 U /mL de penicilina, 100 µg /mL de estreptomicina y 0.25 µg /mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich) a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 3 semanas. El medio se renovó cada 3 días.

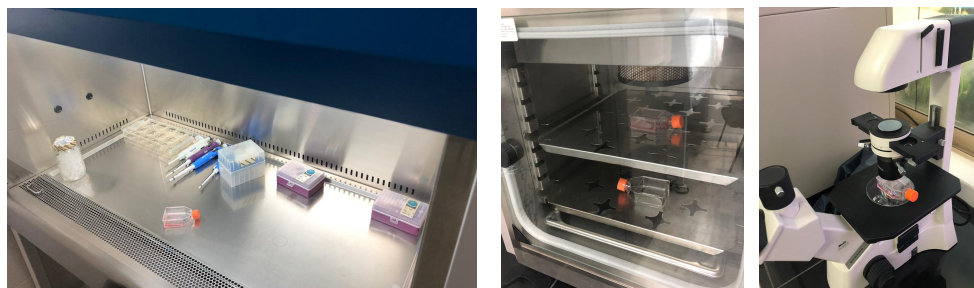


Figura 1. Incubación de las SCAPs y vista en microscopio.

Ensayo de citotoxicidad en microcultivos fluorométricos (FMCA)

Las SCAPs se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de $\sim 2 \times 10^4$ células por pozo, manteniéndolas en medio de crecimiento durante 24 h (Corning Inc., Corning, NY, EE. UU.).

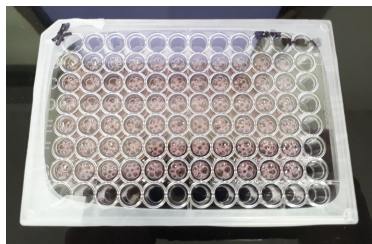


Figura 2. Placa ELISAS 96 pozos.

La reconstitucion del Allergan se realizó mezclando 100 unidades (U) de complejo de neurotoxina tipo A de *Clostridium botulinum* con 0.5 miligramos de cloruro de sodio en forma estéril.

Posteriormente, las SCAPs fueron expuestas a la BtxA en concentraciones de 15, 10, 5, 3, 1, .5, .3, .1, .05, .03, .01, .005, .003, .001U mg/mL y se incubaron a 37° C y 5% de CO₂.

Después de 24 h de incubación, se eliminó el medio y las células se lavaron tres veces con PBS. El ensayo de citotoxicidad se realizó según lo descrito por Larsson y Nygren (Larsson and Nygren, 1989; Laredo-Naranjo *et al.*, 2016) (Del Angel-Mosqueda *et al.*, 2018). En resumen, se disolvió diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma-Aldrich) en DMSO (Sigma-Aldrich) y se mantuvo congelado a -20°C como una solución stock (10 mg /mL).



Figura 3. Se incubó por 24 horas, se eliminó el medio y se lavan las células con PBS 3 veces.

El FDA se diluyó en PBS a 10 µg /mL y se agregaron 200 µL a cada pozo. Las placas se incubaron luego durante 30 minutos a 37° C en la oscuridad. Se utilizó un lector de placas de 96 pozos (Dispensador MicroFill (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.) A 495 nm. Los datos fueron analizados para determinar la viabilidad celular (%).



Figura 4. Lector de placas de ELISA 36 pozos.

Tinción con cristal violeta

Las SCAPs tratadas se lavaron y luego se fijaron con formalina neutra al 10% (BDH Chemicals, Ltd, Londres, Reino Unido) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% (Sigma-Aldrich) durante 1 minuto y luego se lavaron dos veces con PBS. Se analizaron las células en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando la prueba t de diferencia de medias con 95% de confiabilidad. El análisis se realizó utilizando las estadísticas de SPSS para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU.). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Grupo	Media	Desviación Estándar	Viabilidad Celular
Control Negativo	0.1555	0.02	100%
0.001	0.1554	0.02	99.93%
0.003	0.1553	0.02	99.87%
0.005	0.1552	0.02	99.80%
0.01	0.1551	0.02	99.74%
0.03	0.1550	0.02	99.67%
0.05	0.1549	0.02	99.61%
0.1	0.1548	0.02	99.54%
0.3	0.1547	0.02	99.48%
0.5	0.1546	0.02	99.42%
1	0.1545	0.02	99.35%
3	0.1544	0.02	99.29%
5	0.1543	0.02	99.22%
10	0.1542	0.02	99.16%
15	0.0055	0.00	35.36%

Tabla 1. Citotoxicidad de la BtxA en SCAPs in vitro en diferentes concentraciones.

6. RESULTADOS

Cultivo celular

Las células adherentes mostraron diferentes tamaños y morfologías después de 3 semanas en condiciones de crecimiento. También se observó una apariencia espigada alargada con núcleos ovales y centrales. Adicionalmente, varias unidades formadoras de colonias (CFUF) fueron observadas en el pase 3.

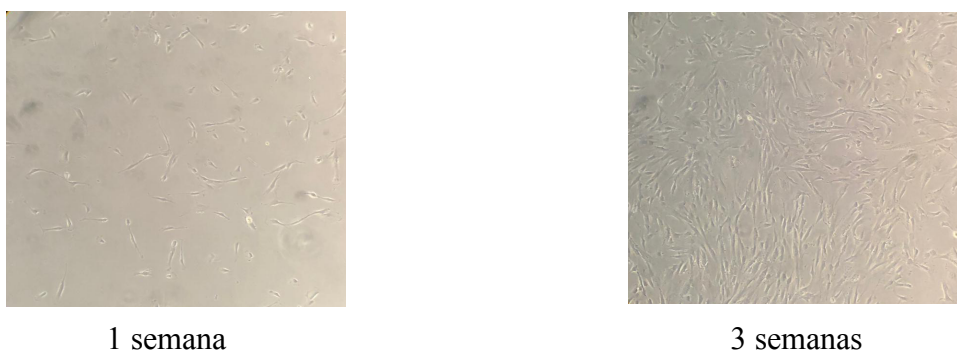
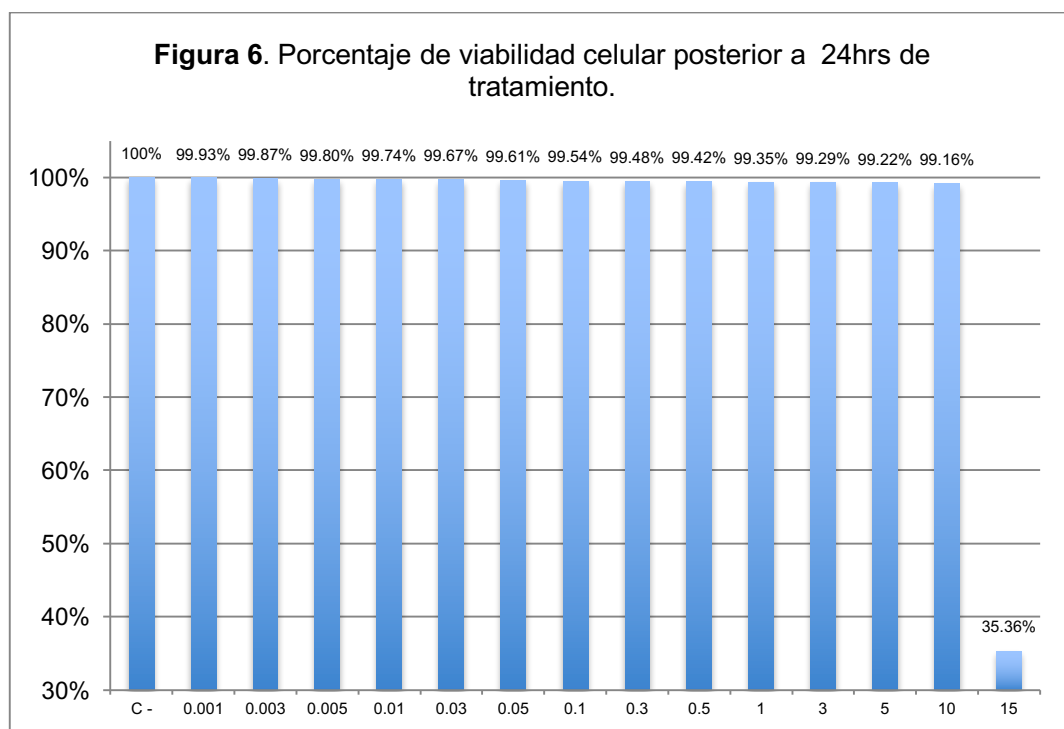


Figura 5. Cultivo de las SCAPs in vitro, magnificación original 10x.

Comparación de la viabilidad celular

La citotoxicidad de las SCAPs expuestas a diferentes concentraciones de la BtxA (15,10, 5, 3, 1, 0.5, 0.3, 0.1, .05, .03, .01, .005, .003, .001U) se evaluaron mediante un ensayo de FMCA. En general, las células expuestas a la BtxA no sufrieron daño o muerte celular, excepto en la concentración de 15U donde se observó muerte celular.

En los diferentes tratamientos de BtxA se observó un efecto concentracion-dependiente donde a menor concentración de la toxina mayor viabilidad celular (Gráfico 1).



Análisis de la morfología celular

Los cambios morfológicos en las SCAPs después de la exposición a medios condicionados se analizaron mediante tinción con cristal violeta. Las células del control negativo mostraron una forma de huso típica con núcleos esféricos, extensiones citoplásmicas y una clara adherencia a la superficie del pozo. Las concentraciones de 10, 5, 3, 1, 0.5, 0.3, 0.1, .05, .03, .01, .005, .003, .001U no tuvieron cambios significativos respecto al control negativo. Sin embargo, en la concentración de 15U se observó muerte celular en un alto porcentaje morfológicos de muerte celular (Figura 2).

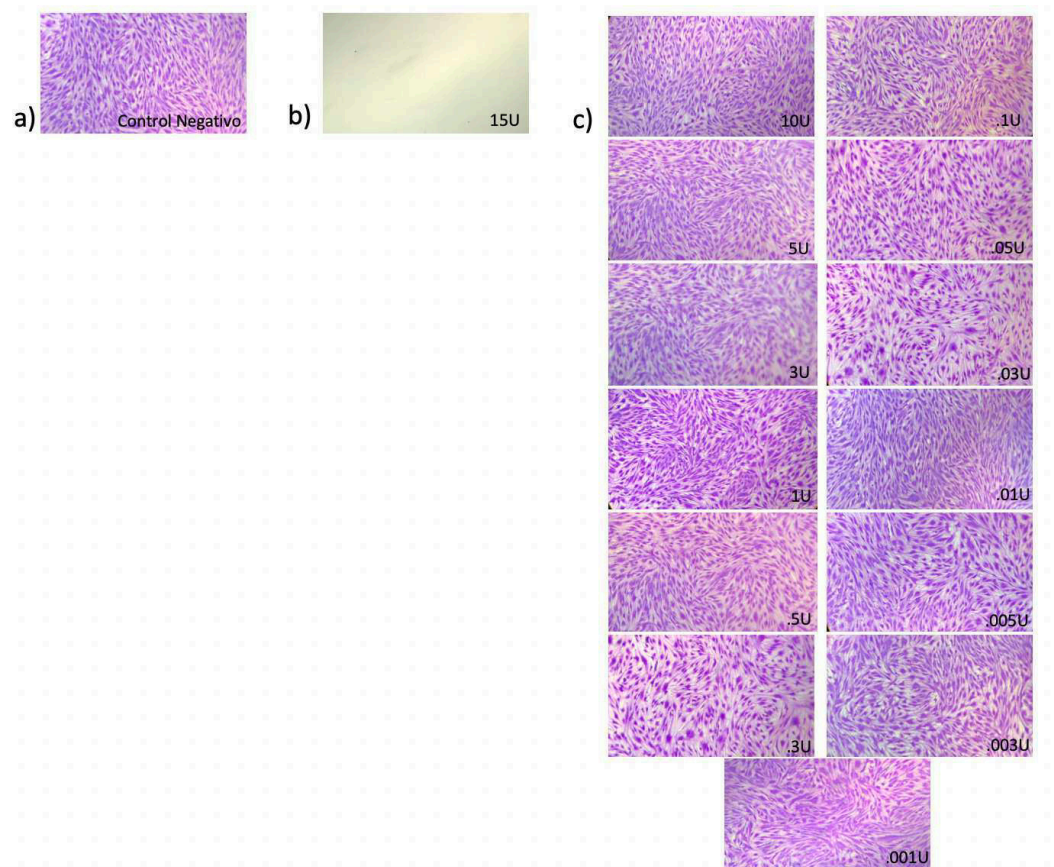


Figura 7. a) Control Negativo. b) Concentración de 15 U. c) Células bajo microscopio en las diferentes concentraciones.

7. DISCUSIÓN

La neurotoxina botulínica es reconocida por su papel importante en el manejo de una amplia variedad de afecciones médicas, especialmente estrabismo y distonías focales, espasmos hemifaciales y diversos trastornos de movimiento espástico, dolores de cabeza, hipersalivación, hiperhidrosis y algunas afecciones crónicas que responden solo parcialmente al tratamiento médico (Scott, 1981). A pesar de estas características la biocompatibilidad de la BtxA no siempre es la deseada. En este estudio, se proporcionó evidencia de que no es citotóxico en las células madre de papila apical in vitro.

En nuestro estudio la neurotoxina botulínica tipo A no causó cambios morfológicos en las SCAPs igual que en el estudio de Williamson donde se informó que no hubo cambios morfológicos en las neuronas de la médula espinal en cultivo, incluida la motoneurona primaria, mientras que la BtxC provoca una rápida inflamación de las terminales sinápticas seguido por degeneraciones de axones, dendritas y cuerpos celulares (Williamson *et al.*, 1998; Schiavo *et al.*, 2000).

Con respecto a las células tumorales, solo hay un informe que se realizó in vitro que sugiere un efecto citotóxico directo de la BtxA. Este informe no se publicó en una revista revisada por pares, pero es parte de una patente, donde se utilizó concentraciones de Botox de 0.001U hasta 20U pero hasta el momento no se ha informado evidencia in vivo de citotoxicidad directa contra células tumorales (Allergan Inc.).

Por lo que sabemos, este es el primer informe que evalúa la citotoxicidad de la BtxA en las SCAP in vitro. Aunque sabemos que BtxC tiene implicaciones para aplicaciones biomédicas y validan aún más las características citológicas más seguras de las preparaciones basadas en la BtxA. Las proteasas de BtxA son actualmente de alto interés farmacéutico y los mecanismos de administración

recientemente destacados podrían avanzar en gran medida en la investigación botulínica en curso (Arsenault *et al.*, 2014).

En conclusión, este estudio encontró evidencia para respaldar la hipótesis de que la BtxA no tiene efecto citotóxico en las SCAPs in vitro. Además, al igual que nuestro estudio, hay investigaciones donde se revela que no existen cambios morfológicos en las células donde se expone la BtxA.

8. CONCLUSIONES

- La neurotoxina botulinica BtxA es capaz de interactuar con SCAPs.
- La BtxA no induce citotoxicidad estadísticamente significativa excepto en la concentración de 15U donde la viabilidad celular disminuyó en su totalidad.
- La BtxA no induce cambios morfológicos significativos en las SCAPs debido a su baja toxicidad, excepto en la concentración de 15U.
- Por lo tanto, la BtxA podría ser una alternativa durante procedimientos regenerativos en endodoncia debido a su baja toxicidad sobre las SCAPs.

9. LITERATURA CITADA

American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. *Pediatr Dent*. 2014; 36(6): 242-50.

American Association of Endodontists. AAE.

Arnon, S. Schechter, R. Inglesby, T. Henderson, D. Bartlett, J. Ascher, M. Eitzen, E. Fine, A. Hauer, J. Layton, M. Botulinum toxin as a biological weapon—Medical and public health management. *JAMA* 2001, 285, 1059–1070.

Arsenault J, Cuijpers SA, Ferrari E, Niranjana D, Rust A, Leese C, O'Brien JA, Binz T, Davletov B. Botulinum protease-cleaved SNARE fragments induce cytotoxicity in neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 2014. 129(5):781-91.

Atassi MZ. Basic immunological aspects of botulinum toxin therapy. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2004;19 Suppl 8:S68-84.

Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *Journal of Dental Research*. 2012;91(5):454-9.

Benecke R. Clinical relevance of botulinum toxin immunogenicity. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2012;26(2):e1-9.

Burgen AS, Dickens F, Zatman LJ. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *J Physiol*. 1949;109:10–24.

Caicedo R, Abbott PV, Alongi DJ, Alarcon MY. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. *Austr Dent J*. 2006; 51(4): 297-305.

Carruthers A, Carruthers J, Lowe NJ, et al. One-year, randomized multicenter, two-period study of the safety and efficacy of repeated treatments with botulinum toxin type A in patients with glabellar lines. *J Clin Res* 2004;7:1–20.

Chen M, Yan T, Ma K, Lai L, Liu C, Liang L, Fu X. Botulinum toxin type A inhibits α -smooth muscle actin and myosin II expression in fibroblasts derived from scar contracture. *Ann Plast Surg*. 2016;77:e46–e49.

Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A (2017) Survival of the apical papilla and its resident stem cells in a case of advanced pulpal necrosis and apical periodontitis. *Journal of Endodontics*. 2007 43, 561–7.

Degouy A, Aubin A, Aubin F, Monnier G, Humbert Ph. La toxine botulique en dermatologie. *Ann Dermatol Venereol*. 2000 127(6-7): 638-42.

Ding G, Liu Y, An Y, et al. Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. *Cells Tissues Organs*. 2010. 191: 357–64.

Ding G, Wang W, Liu Y, et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *Journal of Cellular Physiology*. 2010; 234:15–22.

Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A way forward. *J Am Dent Assoc* 2016;147(5):372-380.

Dorizas A, Krueger N, Sadick NS. Aesthetic uses of the botulinum toxin. *Dermatol Clin* 2014;32:23–36.

Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010; 98(1): 2-14.

Fuks AB. Pulpotomy in primary teeth. *Eur Arch Paediat Dent*. 2006; 7(3):124.

Fuks AB. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *J Endod*. 2008; 34(7 Suppl): S18-24.

González Orta LJ, Font Rytzner A, De Nova García MJ. Investigación con células madres de origen dentario. Actualización. *Gaceta Dental Digital*. 2011.

Goonetilleke, A.; Harris, J. Clostridial neurotoxins. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2004, 75, 35–39.

Gu K, Smoke RH, Rutherford RB. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1996;41: 919–23.

Gutmann J, Harrison J. Posterior endodontic surgery: anatomical considerations and clinical techniques”. *International Endodontics Journal* 1985;18, 8-34.

Hotta M, Li Y, Sekine I. Mineralization in bovine dentin adjacent to glass-ionomer restorations. *J Dent* 2001; 29: 211–5.

Huang W, Forter Ja, Rogachefsky A S. Pharmacology of botulinum toxin. *J Am Acad Dermatol*. 2000 43 (2 Pt 1):249-59.

Jeong HS, Lee BH, Sung HM, Park SY, Ahn DK, Jung MS, Suh IS. Effect of botulinum toxin type A on differentiation of fibroblasts derived from scar tissue. *Plast Reconstr Surg*. 2015;136:171e–178e.

Jiang B, Zu W, Xu J, Xiong Z, Zhang Y, Gao S, Ge S, Zhang L. Botulinum toxin type A relieves sternocleidomastoid muscle fibrosis in congenital muscular torticollis. *Int J Biol Macromol*. 2018;112:1014–1020.

Kim S, Trowbridge HO. Pulpal reaction to caries and dental procedures. In: Cohen S, Burns RC, eds. *Pathways of the Pulp*. St Louis: Mosby; 1998:414–33.

Kisby L. Vital pulp therapy in primary teeth: an update. *Dentistry Today*. 2016;35:112–113.

Koch KA, Brave DG. Bioceramics, part I: the clinician's viewpoint. *Dentistry today*. 2012 Jan;31(1):130.

Kranz G, Haubenberger D, Voller B, Psoch M, Schnider P, Auff E, et al. Respective potencies of Botox and Dysport in a human skin model: a randomized, double-blind study. *Mov Disord*. 2009;24:231-6.

Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nature structural biology*. 1998;5(10):898-902.

Lorenc ZP, Kenkel JM, Fagien S, Hirmand H, et al. A review of onabotulinumtoxinA (Botox). *Aesthet Surg J* 2013;33(1 Suppl): 9S–12S.

Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, Ferrucci L. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2006;61(6):575-84.

Majno G, Joris I. *Cells, tissues, and disease*. Oxford, London: Oxford University Press, 2nd ed. 2004.

Marciniak, C.M.; Harvey, R.L.; Gagnon, C.M.; Duraski, S.A.; Denby, F.A.; McCarty, S.; Bravi, L.A.; Polo, K.M.; Fierstein, K.M. Does botulinum toxin type a decrease pain and lessen disability in hemiplegic survivors of stroke with shoulder pain and spasticity? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am. J. Phys. Med. Rehabil*. 2012, 91, 1007–1019.

Mejare IA, Axelsson S, Davidson T, Frisk F, Hakeberg M, Kvist T, et al. Diagnosis of the condition of the dental pulp: A systematic review. *Int Endod J*. 2012;45: 597–613.

Michaelson P, Holland G. Is pulpitis painful. *Int Endod J*. 2002;35: 829–832.

Moule AJ, Li H, Bartold PM. Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aust Dent J* 1995;40:110–4.

+

Münchau A, Bhatia KP. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ*. 2000;320:161–5.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2007(33), 377-390.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, de Moraes IG, et al. Analysis of the gutta-percha filled area in C-shaped mandibular molars obturated with a modified MicroSeal technique. *Int Endod J* 2009;42:186–97.

Peck, M.W.; Smith, T.J.; Anniballi, F.; Austin, J.W.; Bano, L.; Bradshaw, M.; Cuervo, P.; Cheng, L.W.; Derman, Y.; Dorner, B.G.; et al. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins* 2017, 9, 38.

Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*. 2007;1:35–8.

Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent*. 2000; 28(3): 153-61.

Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod*. 2009;35(5):731-6.

Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda JM. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International Endodontic Journal*, 44, 800–806, 2011.

Schantz EJ, Johnson EA. Preparation and characterization of botulinum toxin type A for human treatment. In: Jankovik J, Hallet M, editors. *Therapy with Botulinum Toxin*. Vol. 109. New York, NY: Marcel Dekker; 1994. pp. 10–24.

Schiavo g, matteoli m, montecucco c: Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev*. 2000 80(2):717-766.

Scott AB. Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans Trans Am Ophthalmol Soc*. 1981;79:734–70.

Sellin LC. The pharmacological mechanism of botulism. *Trends Pharmacol Sci*. 1985;6:80–2.

Smith AJ, Tobias RS, Murray PE. Transdental stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. *J Dent* 2001;29:341–6.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*. 2008; 34:166–171.

Stanley EF, Drachman DB. Botulinum toxin blocks quantal but not non-quantal release of ACh at the neuro-muscular junction. *Brain Res*. 1983;261:172–5.

Staquet MJ, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Pattern-recognition receptors in pulp defense. *Adv Dent Res*. 2011;23: 296–301.

Thyagarajan, B., N. Krivitskaya, J. G. Potian, K. Hognason, C. C. Garcia y J. J. McArdle (2009) "Capsaicin Protects Mouse Neuromuscular Junctions from the Neuroparalytic Effects of Botulinum Neurotoxin A." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331 (2): 361-71.

Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent*. 2007; 35(8): 636-42.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review Part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010; 36: 190–202.

Torabinejad M, Walton RE. *Endodoncia, principios y práctica*. Elsevier: España, 2010.pp. i.

Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 2008;53:9–13.

Tziafas D, Belibasakis G, Veis A, Papadimitriou S. Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. *Adv Dent Res*. 2001; 15: 96-100.

Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984;58:589–99.

Wang S, Mu J, Fan Z, Yu Y, Yan M, Lei G, et al. Insulin -like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res* 2012;8:346 -356.

Williamson lc, neale ea: Syntaxin and 25-kDa synaptosomal-associated protein: differential effects of botulinum neurotoxins C1 and A on neuronal survival. *J. Neurosci. Res*. 1998 52(5):569-583.

Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med* 2019;13:152 -159.

Zhang W, Yelick PC. Vital Pulp therapy—current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Inter J Dent*. 2010; 2010: 856087.

Zhang X, Lan D, Ning S, Jia H, Yu S. Botulinum toxin type A prevents the phenotypic transformation of fibroblasts induced by TGF- β 1 via the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2019.44(2):661-671.

Zhang, S.; Masuyer, G.; Zhang, J.; Shen, Y.; Lundin, D.; Henriksson, L.; Miyashita, S.I.; Martinez-Carranza, M.; Dong, M.; Stenmark, P. Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nat. Commun*. 2017, 8, 14130.

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Lilia Karina Sánchez Ramírez

Candidata para el grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Endodoncia

Tesis:

**CITOTOXICIDAD DE LA NEUROTOXINA BOTULINICA BtxA SOBRE
CELULAS MADRE DE PAPILA APICAL IN VITRO**

Campo de Estudio:

Ciencias de la Salud

Datos personales:

Nacida en Monterrey, Nuevo León el 15 de septiembre de 1993, hija de Luis Roberto Sánchez Garza y Lilia Ramírez Ríos.

Educación:

Egresada de la Universidad de Monterrey, grado obtenido Médico Cirujano Dentista en el 2016.

Experiencia Profesional:

Práctica privada de 2016 a la fecha.